

**DETEKSI GEN INTERLEUKIN-10 (IL-10) PADA SAMPEL KLINIS
TUBERKULOSIS DENGAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**
*Detection of Interleukin-10 (IL-10) Gene in Clinical Samples Tuberculosis by Polymerase
Chain Reaction (PCR) Technique*

Paweli, N. E ¹⁾, Rosana Agus²⁾, Sjafaraenan ³⁾, Mochammad Hatta⁴⁾

^{1,2,3)} Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar

⁴⁾ Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

E-mail : nep.paweli@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian Deteksi Gen Interleukin-10 Lokus -819 Pada Sampel Klinis Tuberkulosis Dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan gen Interleukin-10 pada sampel klinis tuberkulosis paru dengan menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Ekstraksi DNA dari sampel klinis berupa darah kapiler dilakukan dengan menggunakan Metode Boom. Selanjutnya sampel diamplifikasi dengan primer spesifik F: 5'-GACAACACTACTAAGGCTCCTTTGGGA-3', R: 5'GTGAGCAAAGTGGGACACAGAATT-3' pada lokus -819 dengan panjang basa 243 bp. Hasil amplifikasi dengan PCR dari sampel yang telah diekstraksi dengan metode Boom, menunjukkan bahwa pada sampel klinis Tuberkulosis paru terdapat gen IL-10. Hal ini terlihat jelas dari sampel DNA yang diambil dari sampel klinis darah kapiler yang teramplifikasi menggunakan primer spesifik gen IL-10 pada lokus -819 dengan panjang basa 243 bp. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pada sampel klinis Tuberkulosis paru terdapat gen IL-10 yang terlihat dari hasil amplifikasi dengan primer spesifik dengan panjang basa 243bp pada lokus -819.

Kata Kunci : Deteksi gen, Interleukin-10, Tuberkulosis, PCR.

ABSTRACT

The research about "Detection of Interleukin-10 Gene -819 Loci in Clinical Samples Tuberculosis by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique" had been done. The purpose of this research to to compare the presence of Interleukin-10 gene in pulmonary tuberculosis clinical samples using PCR (Polymerase Chain Reaction). Extraction DNA from bloods was done with the Booms Method. The DNA samples extracted from those methods then amplified with specific primers F: 5'-GACAACACTACTAAGGCTCCTTTGGGA-3', R: 5'GTGAGCAAAGTGGGACACAGAATT-3' in -819 loci with base length 243 bp. The results of the PCR amplification of the samples that has been extracted with Boom Method, indicating that the Interleukin-10 genes is contained in pulmonary tuberculosis clinical samples. This can be seen clearly from DNA samples taken from blood capillary are amplified using gene-specific primers Interleukin-10 in -819 loci with a base length of 243 bp. Based on this results, it could be concluded that pulmonary tuberculosis clinical samples contained Interleukin-10 gene revealed by amplification with specific primers in -819 loci with base length 243 bp.

Keywords : Detection gene, Interleukin-10, Tuberculosis, PCR.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit kematian tertinggi di dunia. Demikian pula kematian tinggi di seluruh dunia, diperkirakan dua juta orang meninggal setiap tahun. Diagnosis tuberkulosis pada anak sulit dikonfirmasi sehingga pada umumnya berdasarkan manifestasi klinis, gejala, dan pemeriksaan khusus. Pada dasarnya diagnosis TB ditegakkan berdasarkan pemeriksaan sputum dan biakan. Namun, sensitivitas pemeriksaan sputum terhadap bakteri tahan asam rendah dan biakan sputum mudah berubah (Kusuma, 2007).

Tuberkulosis (TB) adalah infeksi yang disebabkan bakteri patogen intraselular, yakni *Mycobacterium tuberculosis*. Sebagai negara dengan insidensi tertinggi ketiga di dunia, TB merupakan masalah kesehatan di Indonesia. Sistem imunitas pada infeksi TB terutama tergantung pada imunitas seluler yaitu interaksi antara makrofag, sel T dan sitokin. Sitokin mempunyai peranan penting dalam pertahanan inang terhadap pathogen (Wasityastuti *et al.*, 2009).

Tuberkulosis paru (TB paru) merupakan salah satu penyakit infeksius, yang terutama menyerang penyakit parenkim paru. Nama tuberkulosis berasal dari tuberkel yang berarti tonjolan kecil dan keras yang terbentuk ketika sistem kekebalan membangun tembok mengelilingi bakteri dalam paru. TB paru ini bersifat menahun dan menimbulkan nekrosis jaringan (Wahyuningsih, 2014).

Pengenalan mikroba patogen oleh sel fagosit memicu terjadinya aktivasi dan produksi sitokin dan kemokin. Terdapat dua macam kelompok sitokin yang berperan dalam respon imun terhadap mikroba patogen, yaitu sitokin

proinflamasi serta sitokin anti inflamasi (Kusuma, 2007).

Gen IL-10 mengkode sitokin antiinflamasi yang memainkan peran penting dalam regulasi respon imun inang terhadap *M. tuberculosis*, seperti penekanan sel T, penonaktifan makrofag, modulasi sitokin pro-inflamasi. Sitokin ini adalah inhibitor kuat dari sel T helper (Th) 2, termasuk IL-2 dan Interferon (IFN)- γ . Aktivitas ini berperan untuk menunjukkan awal sebagai faktor inhibisi sintesis sitokin (Handojo, 2004).

Pendeteksian ada tidaknya suatu gen dapat dilakukan dengan berbagai cara, satu diantaranya dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) yang merupakan suatu metode molekuler yang mampu bekerja pada substansi yang sangat kompleks secara cepat dan spesifik yang bekerja dengan cara memperbanyak potongan DNA yang dikehendaki dari suatu organisme (Handoyo and Ari, 2009).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini perlu dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya gen Interleukin-10 pada sampel klinis tuberkulosis paru dengan teknik Polymerase Chain Reaction (PCR).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah vacuum tube, vacuum pump, sentrifugasi, enkas, tabung eppendorf steril 1,5 ml, tabung steril 0,5 ml, rak tabung eppendorf, vortex, gyratory shaker, mikropipet (1000 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 200 μ l), tip aerosol steril 20 μ l dan 30 μ l, tip steril 250 μ l dan 1000 μ l, tabung Valcon 50 ml, tabung vial PCR, Thermo Cycler PCR,

transilluminator UV, gel doc, tangki larutan penyangga elektroda, timbangan digital, erlenmeyer 250 ml, sisir gel, oven, cetakan gel, tabung ukur 100 ml, inkubator, freezer, spektrofotometer, kulkas, microwave, sumur microplate dan elektroforesis.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah, L2 (Washing buffer), L6 (lysis buffer), HCl 32%, larutan RNaseaway, SiO₂, larutan NaOH, Primer Interleukin-10 (IL-10) F: 5'GACAACACTACTAAGGCTCCTTTG GGA-3', Primer Interleukin-10 (IL-10) R: 5'GTGAGCAAAGTGGAGGCACAGAAT T-3', Etanol 70%, aseton, larutan TE-elution buffer, buffer elektroforesis Tris acetic acid-buffer EDTA, (TAE), larutan loading dye, dNTP's, aquadest steril, gel agarosa 2%, metanol asetat, taq polimerase, NE-Buffer, aquabidest, marker DNA 20 bp ladder, Ethidium bromide dan kertas parafilm.

Sampel

Sampel yang digunakan adalah 8 sampel klinis tuberkulosis paru dan 2 sampel klinis orang sehat berupa sampel darah kapiler koleksi Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler, Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

Ekstraksi DNA dengan Metode Boom (Hatta and Smits, 2007)

Sampel darah dipindahkan ke tabung eppendorf masing-masing sebanyak 1 ml, lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit. Lalu ditambahkan 500 µl larutan L6 (lysis buffer), kemudian dihomogenkan selama 30 menit. Campuran buffer L6 yang telah

mengandung DNA hasil ekstraksi disentrifus selama 2-3 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Suspensi diatom 20 µl ditambahkan ke dalam tabung kemudian dirotasi dan diaduk dengan menggunakan gyratory shaker, kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran diatom dan buffer L6 dirotasi kembali menggunakan sentrifus dengan mikrosentrifus eppendorf pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dari setiap tabung dipisahkan dengan menggunakan pengisap yang terbuat dari pipet Pasteur dan dihubungkan dengan vacuum pump. Sekitar 10 µl dari suspensi tersebut disisakan. Supernatan dicuci sebanyak 2 (dua) kali dengan menggunakan 1 ml buffer pencuci L2.

Buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml, dirotasi dan disentrifus pada 13.000 rpm selama 10 detik, kemudian supernatan dibuang. Endapan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70% dan 1 ml aseton masing-masing sebanyak 2 (dua) kali. Aseton yang tersisa dalam endapan (sedimen) diuapkan dengan membuka penutup tabung dan dipanaskan dengan oven pada suhu 56°C selama kurang lebih 10 menit.

Setelah sedimen mengering, tambahkan 50 µl air destilata, kemudian dirotasi secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut dapat larut, lalu tabung diinkubasi dalam inkubator pada suhu 56°C selama 10 menit. Kemudian, campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil secara hati-hati sebanyak 20 µl dan dimasukkan ke dalam tabung baru. Hasil ekstraksi disimpan pada suhu -20°C.

Pengukuran Konsentrasi DNA template

DNA template dikeluarkan dari freezer dan disentrifius dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit, lalu dibuat Reagent Detecting Labelling dan dimasukkan kedalam tabung valcon. Setelah itu dimasukkan 45 µl air destilata dan 5 µl sampel DNA template serta 50 µl reagent dalam tiap sumur sebanyak 10 sumur. Campuran yang telah berada dalam tiap sumur kemudian dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer lalu divisualisasi berdasarkan hasil Optical Density tiap sampel DNA template yang tertera di layar spektrofotometer dengan menggunakan panjang gelombang 260 nm dan 320 nm. Untuk mengukur konsentrasi DNA template, hasil Optical Density tiap sampel DNA template dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{(\text{OD } 260 \text{ nm} - \text{OD } 320 \text{ nm}) \times \text{pengenceran} \times 50}{\text{Total volume sampel}}$$

Amplifikasi DNA IL-10 dengan PCR

Sebelum melakukan proses amplifikasi dengan PCR, PCR Mix dibuat terlebih dahulu. PCR Mix dibuat dengan mencampurkan 2,5 µL 10x buffer, 0,1 µL Taq Polymerase, 0,1 µL dNTP's Mix (ACTP, CCTP, GCTP, TCTP), 0,1 µL Primer IL-10 Forward, 0,1 µL Primer IL-10 Reverse dan 17,3 µL Aquabidest ke dalam tabung vial PCR. Kemudian sebanyak 20 µL PCR Mix ditambah 5 µL template DNA yang telah diekstraksi dari sampel darah dimasukkan ke dalam tabung vial PCR. Kontrol positif berupa tabung vial berisi DNA orang sehat sedangkan kontrol negatif, berupa tabung vial berisi air destilata yang tidak ditambahkan template DNA.

Untuk amplifikasi gen IL-10 primer spesifik yang digunakan adalah F: 5'GACAACACTACTAAGGCTCCTTTG

GGA-3', dan R: 5'GTGAGCAA ACTGAGGCACAGAATT-3'. Parameter untuk thermocycling dari IL-10 adalah sebagai berikut: inkubasi selama 1 menit pada suhu 95°C, 1 menit pada 56°C, 2 menit pada suhu 72°C pada tiap siklus dan diulangi sebanyak 35 siklus, kemudian langkah ekstensi terakhir 10 menit pada suhu 72°C. Hasil produk PCR sebesar 243 bp. Amplikon divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% diwarnai dengan ethidium bromide.

Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis

Gel agarosa 2% dibuat dengan mencampurkan 0,8 gr serbuk agarosa ke dalam 40 mL TBE (Tris-Buffer-EDTA) di Erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil, kemudian dipanaskan pada microwave hingga mendidih, lalu ditambahkan 2 µL ethidium bromide dan dihomogenkan. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel, kemudian 9 µL produk amplifikasi dicampur dengan 1 µL larutan loading dye.

Setelah tercampur dengan baik, masing-masing sampel dicampurkan dengan 10 µL loading buffer, kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2% yang telah terendam dalam tanki yang berisi Tris acetid acid-Buffer-EDTA. Dimasukkan juga 3 µL marker DNA 20 bp Ladder ke dalam sumur gel agarosa, kemudian elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt hingga sampel berada pada $\frac{3}{4}$ dari volume. Setelah dielektroforesis sampel kemudian diamati pada sinar Ultra Violet (UV) pada gel doc.

Analisis Data

Hasil deteksi PCR dengan elektroforesis dianalisis berdasarkan ada tidaknya pita DNA (band DNA) yang terbentuk dan data disajikan secara deskriptif dengan menggunakan gambar hasil elektroforesis gel agarosa 2%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA dari Darah dengan Metode Boom

Tahapan awal dalam penelitian ini adalah ekstraksi DNA dari darah kapiler yang diperoleh dari 5 laki-laki dan 5 orang perempuan, 8 orang merupakan sampel klinis Tuberkulosis paru dan 2 sampel klinis orang sehat sebagai kontrol positif. Tujuan dari dilakukannya ekstraksi DNA untuk memisahkan genom DNA dari molekul lain yang terdapat dalam sel. Pada tahapan ini, ekstraksi DNA dilakukan secara kimiawi dengan menggunakan metode Boom. Metode Boom merupakan metode untuk memecahkan DNA dan pengaktifan asam nukleat dengan menggunakan agen guanidinium thiocyanate (GuSCN) serta partikel silika (sigma diatom) yang berfungsi untuk menangkap atau mengikat DNA. Jadi, tahapan ekstraksi yang ada pada metode Boom, yakni tahapan lisis (pemecahan sel) dan DNA binding atau pengikatan DNA.

Pemecahan sel dilakukan dengan penambahan larutan L6 yang mengandung GuSCN (guanidinium tiosianat) yang berfungsi untuk membantu melisiskan sel dengan memanfaatkan sifat korosif yang dimiliki GuSCN. Senyawa Tris berfungsi sebagai pelarut dalam larutan L6. Senyawa EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) mampu menghilangkan ion magnesium yang sangat diperlukan untuk mempertahankan integritas

keseluruhan sel serta dapat menghambat enzim seluler yang dapat merusak DNA.

Pada saat sel pecah (lisis), DNA langsung diikat dengan suspensi diatom yang memasuki pori-pori dari diatom akibat adanya gaya tarik menarik dari silika dan GuSCN yang membungkus DNA. DNA yang diperoleh belum murni karena masih terdapat protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar dimana RNA tersebut berasosiasi kuat dengan DNA sehingga perlu dilakukan pembersihan debris sel.

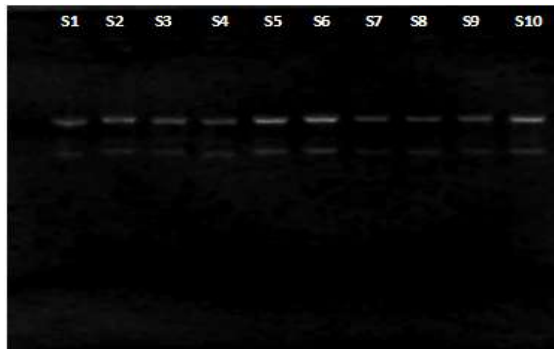
Larutan L2 yang mengandung 120 gr GuSCN (guanidinium 6 tiosianat) dan 100 mL Tris HCL 0,1 M, pH 6,4 ini berfungsi untuk menghilangkan detergen (Triton X-100) dari sampel. Pencucian dengan L2 dilakukan 2 kali untuk meningkatkan efektifitas pencucian sehingga tidak ada detergen yang tersisa. Larutan Etanol 70% berfungsi untuk memekatkan DNA dan menyatukan DNA dengan diatom. Pencucian dengan etanol 70% dilakukan 2 kali untuk meningkatkan efektifitas dalam menyatukan DNA serta membuang kandungan GuSCN pada sampel. Pencucian terakhir dengan menggunakan larutan aseton yang berfungsi untuk mengeringkan diatom sehingga memungkinkan etanol dan GuSCN yang tersisa dalam sampel akan menguap dan sampel menjadi serbuk.

Tahap terakhir dari metode ini ialah dengan menambahkan buffer TE yang mengandung EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) dan Tris HCL pH 8.0 dimana TE ini berfungsi untuk rehidrasi DNA yaitu membantu melepaskan dan menarik DNA keluar dari diatom.

Visualisasi Hasil Ekstraksi DNA dengan Elektroforesis

Ekstrak DNA yang telah diperoleh selanjutnya diuji kualitasnya (uji kualitatif DNA) dengan elektroforesis agarosa. Kualitas dari DNA yang diperoleh di elektroforesis pada tegangan 100 Volt yang sebelumnya telah diberikan larutan *Loading dye* atau larutan penyangga bewarna yang berfungsi untuk menambah densitas sehingga DNA berada di bagian bawah sumur, selain itu pewarna ini digunakan untuk memudahkan meletakkan DNA ke dalam sumur dan menandai migrasi DNA (Novitasari *et al.*, 2014).

Produk DNA yang dihasilkan dari proses ekstraksi divisualisasi pada elektroforesis untuk mengetahui keberadaan pita DNA yang terbentuk sebelum dilakukan amplifikasi PCR. Elektroforesis dilakukan pada gel berupa gel agarosa sehingga akan memisahkan molekul berdasarkan muatan listrik molekulnya. Hasil visualisasi elektroforesis terlihat pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil Ekstraksi DNA dengan Metode Boom

Keterangan:

S1-S8 = Sampel Klinis Tuberkulosis Paru
S9-S10 = Sampel Klinis Orang Sehat (Kontrol Positif)

Berdasarkan hasil visualisasi dengan elektroforesis pada gambar 5 terlihat bahwa kualitas pita DNA dari hasil ekstraksi menggunakan metode

Boom bagus, dimana pada semua sampel diperoleh pita DNA. Namun yang membedakannya adalah tebal dan tipisnya pita DNA yang divisualisasi. Pada S5, S6 dan S10 pita yang terbentuk tebal, hal ini menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi banyak. Berbeda dengan pita DNA pada sampel S1, S2, S3, S4, S7, S8 dan S9 dimana pita yang terbentuk tipis, hal ini menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi sedikit sehingga pita DNA yang terbentuk setelah dilakukan ekstraksi dan visualisasi pada elektroforesis tampak tipis.

Tebal tipisnya pita DNA yang terbentuk menunjukkan kandungan atau banyaknya DNA yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama.

Uji Kuantitatif DNA dengan Spektrofotometer

Umumnya dalam pengujian kuantitatif ini digunakan panjang gelombang 260 nm dan 320 nm. Menurut Suharsono dan Widyastuti (2006) Pengukuran dilakukan dengan cara mengencerkan suspensi DNA template yang digunakan sebagai sampel atau objek dalam penelitian, kemudian dibaca nilai absorbansinya pada panjang gelombang yang digunakan lalu di hitung menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(\text{Abs. } 260 \text{ nm} - 320 \text{ nm}) \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran}}{\text{Total volume sampel}}$$

Hasil kuantifikasi dengan menghitung konsentrasi menggunakan spektrofotometer dilihat pada Table 1.

Tabel 1. Nilai kuantitas DNA genom

Sampel	Panjang Gelombang		Konsentrasi (µg/ml)
	λ_{260}	λ_{320}	
1	0,095	0,042	0,53
2	0,114	0,054	0,6
3	0,139	0,047	0,92
4	0,133	0,045	0,68
5	0,142	0,047	0,95
6	0,139	0,045	0,94
7	0,146	0,048	0,98
8	0,145	0,045	1
9	0,15	0,05	1
10	0,172	0,061	1,1

Berdasarkan hasil perhitungan DNA genom hasil ekstraksi memiliki konsentrasi yang bervariasi, mulai dari 0,53 sampai dengan 1,11 µg/ml. Konsentrasi DNA genom yang diperoleh tersebut cukup memadai untuk digunakan sebagai DNA template pada reaksi PCR. Jumlah DNA template yang dibutuhkan dalam reaksi PCR hanya 10 ng/ml per reaksi (Sambrook & Russel, 2001). Sedangkan menurut Wilkerson *et al.* (1993) dalam Saraswati (2007) menyatakan bahwa konsentrasi DNA yang baik untuk melakukan proses PCR berkisar antara 0,5 sampai 6,5 µg/ml. Oleh karena itu, 1 µl DNA genom hasil ekstraksi sudah memadai untuk digunakan dalam reaksi PCR.

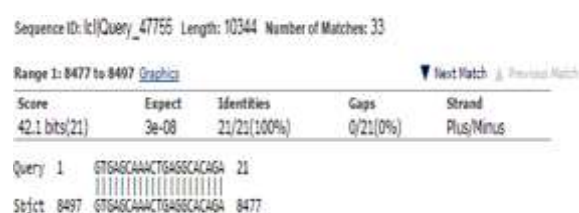
Hasil BLAST Urutan Primer dengan Urutan Nukleotida Interleukin-10

Sampel DNA hasil ekstraksi dengan metode Boom kemudian diamplifikasi menggunakan primer spesifik untuk gen Interleukin-10 5'-GACAACACTACTAAGGCTCCTTTG GGA-3', dan R: 5'-GTGAGCAA ACTGAGGCACAGAATT-3' pada lokus -819 dengan panjang basa 243 bp. Untuk

mengetahui ketepatan penggunaan primer spesifik tersebut, maka dilakukan proses BLAST pada NCBI dapat dilihat pada gambar 6 dan gambar 7.



Gambar 6. Hasil BLAST untuk primer forward Interleukin-10



Gambar 7. Hasil BLAST untuk primer reverse Interleukin-10

Berdasarkan hasil BLAST gen Interleukin-10 dari NCBI terhadap primer forward yang digunakan, menunjukkan hasil identities sebesar 96%. Hal ini berarti bahwa primer forward yang digunakan untuk mendeteksi gen Interleukin-10 memiliki kesamaan sekuens DNA dengan data Gen Bank untuk nukleotida Interleukin-10 sebesar 96%. Sedangkan hasil BLAST terhadap primer reverse menunjukkan hasil identities sebesar 100%, artinya bahwa penggunaan primer yang digunakan adalah benar.

Visualisasi Hasil Polymerase Chain Reaction

Pada proses PCR dilakukan, digunakan primer spesifik yakni F: 5'-GACAACACTACTAAGGCTCCTTTG GGA-3', dan R: 5'-GTGAGCAA ACTGAGGCACAGAATT-3' untuk lokus -819, selanjutnya dilakukan visualisasi pada elektroforesis sehingga diketahui

panjang dari lokus adalah 243 bp. Hasil visualisasi dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Hasil Amplifikasi Sampel dengan Primer Spesifik Interleukin-10

Keterangan :

M = Marker

1-8 = Sampel Klinis Tuberkulosis paru

9-10 = Sampel Klinis Orang Sehat (Kontrol Positif)

N = Kontrol Negatif

Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis tersebut, terlihat bahwa sampel klinis Tuberkulosis paru dan orang sehat, terdapat gen Interleukin-10. Hal ini terlihat jelas dari hasil visualisasi dengan elektroforesis pada gambar 8, dimana sampel DNA yang diambil dari sampel klinis berupa darah kapiler, teramplifikasi 100% menggunakan primer spesifik gen Interleukin-10 pada lokus -819 dengan panjang basa 243 bp dan kualitas pita DNA dari ekstraksi dengan menggunakan metode Boom adalah baik.

Hasil amplifikasi seperti yang tampak pada Gambar 8, menunjukkan bahwa urutan nukleotida primer tersebut dapat teramplifikasi dengan baik yang ditunjukkan oleh munculnya pita DNA. Hal ini berarti pada sampel DNA yang digunakan terdapat sejumlah sekuens DNA yang berkomplemen dengan primer.

Terdapat perbedaan ketebalan pita DNA pada kedelapan sampel klinis Tuberkulosis paru. Pita DNA 5 dan 6 yang teramplifikasi dari sampel klinis Tuberkulosis paru lebih tebal dibandingkan pita dari sampel klinis Tuberkulosis paru lainnya dan cenderung

hampir sama dengan pita yang dimiliki oleh orang sehat sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Munculnya pita DNA pada semua sampel menunjukkan bahwa untuk membuktikan keberadaan gen Interleukin-10 bisa menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik pada lokus -819 yang digunakan pada penelitian ini.

Selain itu, konsentrasi DNA yang digunakan sebagai template dalam PCR sangat mempengaruhi hasil PCR, dimana berdasarkan hasil perhitungan diperoleh bahwa konsentrasi DNA yang digunakan cukup tinggi dan konsentrasi tertinggi berada pada sampel 10 dan 9 yang merupakan sampel klinis orang sehat, diikuti dengan sampel 8,7,5,6,3,4,2 dan 1 yang merupakan sampel klinis Tuberkulosis, sehingga ketika amplicon PCR tersebut di elektroforesis maka akan terbentuk pita yang cukup tebal baik pada sampel klinis tuberkulosis maupun orang sehat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pada sampel klinis Tuberkulosis paru terdapat gen Interleukin-10 yang terlihat dari hasil amplifikasi dengan primer spesifik dengan panjang basa 243 bp pada lokus-819.

Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi kemungkinan variasi genetik yang terjadi pada Interleukin-10 disertai pengujian besar kadar sitokin Interleukin-10 pada sampel klinis Tuberkulosis paru maupun orang sehat.

DAFTAR PUSTAKA

- Handojo, I. 2003. **Pengantar Imunoasai Dasar**. Airlangga University Press. Surabaya.
- Handojo and F. Ari. **PCR sebagai Solusi Baru**. <http://academia.edu>. Diakses pada tanggal 6 Mei 2015.
- Hatta, M. and H. L, Smits. 2007. **Detection of *Salmonella typhi* by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine and Stool Samples**. *American J. Tropical Medicine Hygiene*. Vol 76 : 139-143.
- Kusuma, C. 2007. **Diagnostik Tuberkulosis Baru**. *Seri pediatrik*. Vol 8(4) : 143-151.
- Novitasari, D.A., Elvyra R., Roslim, D.I., 2014. **Teknik Isolasi dan Elektroforesis DNA Total Pada *Kryptopterus apogon* (Bleeker 1851) Dari Sungai Kampar Kiri Dan Tapung Hilir Kabupaten Kampar Provinsi Riau**. Vol 1(2): 257-261.
- Sambrook, J. and DW. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed ke-3**. Cold-Spring Harbor Laboratory Pr. New York.
- Saraswati, N. P. 2007. **Deteksi dan Identifikasi Gen *cry4* Pada Isolat *Bacillus thuringensis* Daerah Bogor Dan Sekitarnya**. Skripsi. Jurusan Biokimia. FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suharsono dan U. Widyastuti. 2006. **Penuntun Praktikum Pelatihan Teknik Pengklonan Gen**. Pusat Penelitian Sumber Daya Hayati dan Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wahyuningsih, E. 2014. **TB Paru**. <http://eprints.undip.ac.id>. Diakses pada tanggal 6 Mei 2015.
- Wasityastuti, W. Y., W Subronto. M. HNE Soesatyo. 2009. **The Profile of Interferon- γ (IFN- γ) and Interleukin-10 (IL-10) in Pulmonary Tuberculosis Patients**. *TMJ*. Vol 1(2) : 13-22. <http://etd.repository.ugm.ac.id>. Diakses pada tanggal 19 April 2015.